

磁性体微粒子による核酸分離・抽出の自動化

System for Automated DNA Extraction Using Magnetic Particles

田島秀二 プレシジョン・システム・サイエンス株式会社

H. Tajima, Precision System Science Co., Ltd.

The separation and extraction of nucleic acid and a system for the automation of process are described. The process, which is a prerequisite for genome analysis, can be executed by centrifugation, filtration, or the use of magnetic particles. The key advantage of the latter is that target materials (DNA, etc.) captured on the surface of the magnetic particles can be separated from a liquid reaction mixture by bringing a magnet near to the mixture. This makes it possible to develop a simple and precise separation and extraction process. The magtration technology that we developed is based on a unique principle for reaction control of magnetic particles and a reagent, and speed up can be used to develop a less expensive and more flexible automation system that will significantly DNA functional analysis. Applied technology of magnetism and magnetic particles method is very attractive research and development theme that can be used not only for nucleic acid separation and extraction, but also for a wide variety of other purposes.

Key words: magnetic particles, DNA extraction, laboratory automation, DNA functional analysis

1. ま え が き

近年、遺伝子研究が、医、農、工、理、薬学など、さまざまな分野で行われ、その発達に伴い、遺伝子診断・治療、遺伝子組み換えによる農作物、医薬品あるいは生分解性をもった化成品などが成果として生み出されている。今後、ますます研究テーマが拡大し、遺伝子応用技術開発が行われていくものと考えられるが、その中では、当然、効率の良い迅速な遺伝子取り扱い作業が要求されてくる。しかしながら、遺伝子研究における現状は、優れた環境とはいえ、自動化も遅れている。特に遺伝子研究には不可欠の核酸の分離・抽出、あるいは、その上流・下流の一連の作業は研究員の貴重な時間を奪っている。筆者は、臨床検査の自動化において、磁性体微粒子を利用した免疫測定装置開発の経験を有しているが、その技術が核酸の分離・抽出にも応用できることに着目し、その製品化を行った。本稿では、装置原理・磁性体微粒子の特徴を中心に、遺伝子研究における自動化の現状および将来への展望などを紹介する。

2. 核酸分離・抽出作業の現状

現在行われている核酸の分離・抽出は、細胞・細胞核・核酸をつつむ、組織・膜の脂質・タンパク質などを、界面活性剤・酵素などを使って溶解し、フェノール、クロロホルム、アルコールなどにより精製するもので、分離工程には主として遠心分離器が使用され、反応液ごとに分離作業が繰り返される^{1)~4)}。その煩雑な工程は、ほとんどが用手法にて行われていたが、最近、多量処理を要求される施設向けには、遠心分離器を中心にして、ラックの搬送、ロータへの出し入れ、試薬分注などを自動化した装置も提供されつつある。しかし、遠心器との自動連動システムは大がかりになり、一般の研究施設においては使いにくい。そこで、ガラス繊維フィルターによる分離法を利用して、比較的簡便な自動化も発案されているが、分離の際、いろいろな挟雑物もフィルター表面に共存することとなり、目的によっては、利用できないのが現実である。磁性体微粒子法は、シリカ化合物、ポリスチレン・ラテックスなどの高分子化合物などの、物理的あるいは化学的結合性と酸化鉄(Fe_2O_3)など強磁性体の着磁性、および微粒子であることの特性を利用したもので、素材としては、以前から磁石付ラックなどの器具を使って、一部、核酸の分離・抽出に使われていたが、汎用性はあまり高くはなかった^{5)~7)}。しかし、免疫測定分野においては、抗体の担体として磁性体微粒子の利用が急速に進み、化学発光測定原理と結びついて、現在欧米の大手試薬メーカーによる全自動測定装置が開発され、上市されつつある。筆者は、前述のとおり、臨床機器開発の過程で、磁性体微粒子の優位性を認識し、処理方法に関する新規着想をもとに、遺伝子分野での自動化に取り組んだ。

3. 磁性体微粒子の特徴・役割

磁性体微粒子の特徴は、 $0.1\sim 10\mu\text{m}$ 程度の大きさで、工学的には“超微粒子”⁸⁾であって、同体積の固体と比較して表面積が大きいことである。例えば、 1cm 角の物体を $1\mu\text{m}$ 角に切断して比較すると、表面積は1万倍にもなる。この形状は、液体中の捕獲目的物質に対して圧倒的な接触倍率をもつこととなり、結果的に反応効率が良く、短時間反応あるいは微量物質の高捕獲性能を有することになる。

また、表面に捕獲・吸着した物質を液体中から分離させる場合、単に磁石を近づけることで達成でき、フィルター法、遠心法に比べ、確実・簡便な作業である。さらにもう一つ優れた特性は、一度液体から分離・捕獲された粒子を、磁石を取り除き、次反応工程にて攪拌を行えば、再懸濁状態をつくり得ることである。この微細な粒子として液体中に再分散できる超常磁性は、目的物質以外を除去し洗浄する場合、あるいは、試薬などと順次必要となる反応を考えると、大きな利点といえる。また、ピュアーな条件を維持できることは、DNA だけではなく、壊れやすく、挟雑物の影響を受けやすい RNA, mRNA, あるいは、微量定量分析にも利用可能となる。さらに触れるならば、粒子表面にさまざまな抗体、プライマー、プローブなどの特異反応物質を結合する場合、数リットルのビン一つで、一括一度に大量のバルクをつくれることになり、将来、試薬などを製造する際の採算性を考えると、無視できない特性といえる。そうした磁性体微粒子の基本的な性質を生かして、世界的には 20 数種類がすでに販売されていて、今後、磁性体の合理的性能が認識されていけば、さまざまな研究目的に合った素材開発が行われていくものと思われる。そのおもなものは、a. 強磁性物質 (γ - Fe_2O_3 , Fe_3O_4 など) と PS など高分子化合物の混合物あるいは表面コーティング粒子、b. シリカコーティング粒子、c. Fe_2O_3 含有シリカ多孔質体、d. 強磁性微粒子とセルロースキャリアーの混合物などであり、全く新しい素材としては、e. 磁性細菌が合成する磁性

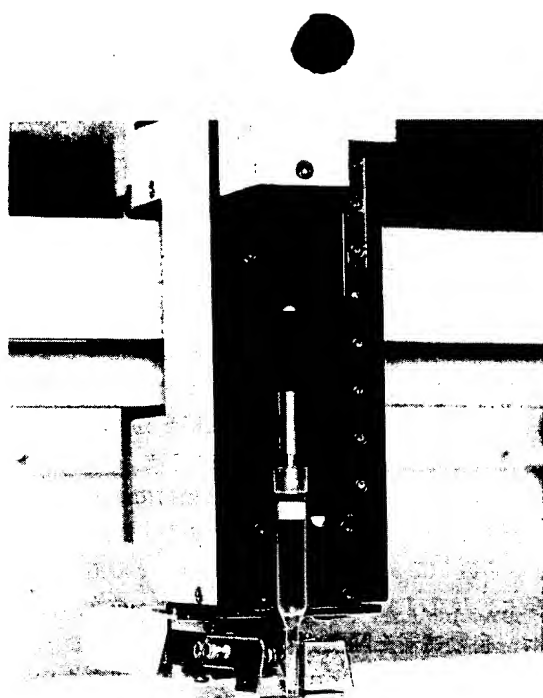
粒子も挙げられる。各種粒子表面の組成により、高分子表面をもつものは、官能基、ストレプトアビジン、オリゴ dT 結合などを利用した化学反応による目的物質の単離、シリカ表面をもつものは、核酸との電位差、親和性を利用した物理吸着^{9), 10)}、あるいは、菌体の捕獲にはセルロース繊維と磁性粒子を組み合わせる方法もありうる。また、磁性細菌による磁性微粒子は、培養方法の確立と並行して、粒子を覆う有機薄膜に、遺伝子操作によるタンパク質発現などの研究も進んでいて、将来、特異反応を利用した遺伝子の機能解析にも応用が期待されている^{11)~15)}。このように、磁性体微粒子は応用性に富んだ優れた素材であるが、この粒子を実際に扱う場合、粒子が微細であり、試薬そのものも 10 μl から数 100 μl と少量であるため、その液体中の粒子を対象に、反応工程に必要な分離・攪拌・洗浄などを行うことは、自動機器を開発する上では非常にデリケートな機械制御機構をつくることとなり、複雑で高価なものとならざるをえなかった。さらに、遺伝子診断においては、PCR, NASBA などの DNA 増幅技術の利用と一対となるもので、検体間のクロスコンタミネーションは、決定的な測定誤差を生ずることとなり、洗浄ノズルなどを使った通常の機械構造では防ぎきれず、実用化に当たっては、解決すべき問題が多くあった。

4. Magtration Technology による自動化

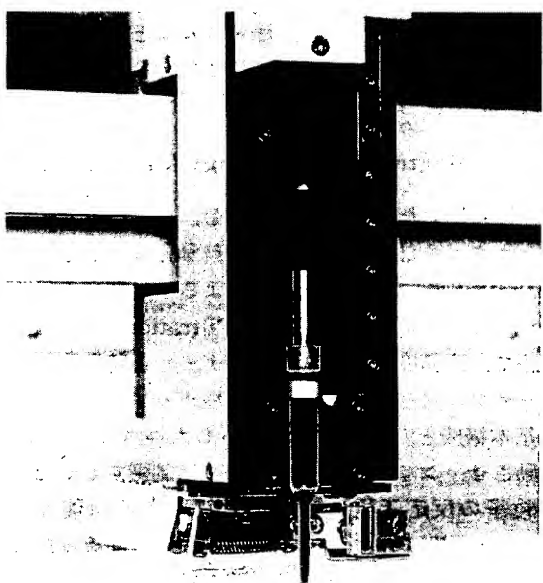
磁性微粒子の優れた特徴を活用し、遺伝子研究の目的に合ったさまざまな反応を行いうる自動化技術として、筆者は Magtration Technology による製品開発を行った。Magtration とは、Magnetic と Filtration を掛け合わせた造語で、高精度分注機（シリンダー）と特殊形状のディスプレイブル分注チップ、その分注チップに着脱自在な磁石を基本構成とし、その一体化されたユニットを X-Y-Z 軸駆動させ、シリンダーを吸引・吐出制御することで、試薬と粒子の反応工程に自在に対応できる原理である。Magtration Technology で使用される分注チップは、先端部が図のようにキャピラリー状で細く、その上部は、反応容器から吸引した液体の容量に見合った保持部となっている。上部シリンダーと一体化されたノズルがディスプレイブルチップを圧入により装着し、反応容器の溶液を吸引あるいは吐出する際、キャピラリー部側面に磁石が必要に応じて装着され、キャピラリーを通過する流体中の磁性体微粒子に対し、至近距離での強磁力により、キャピラリー内壁部に粒子を捕獲・分離できる。既存の装置概念では、一つの反応容器を搬送ラインにのせ、そのライン周辺に磁石、試薬分注・廃棄、ボルテックス攪拌、ノズル洗浄装置などをその反応工程どおりに用意し、試薬の分注と吸引廃棄あるいは磁性微粒子の分離を一つの容器を対象に行うのに対し、Magtration Technology は、あらかじめ必要試薬をプレートホールに分注しておき、キャピラリーに捕獲



Fig. 1 Section of a silica porous bead containing Fe_2O_3 (500Å diameter, $\times 200,000$).



(a) Attached magnet



(b) Detached magnet

Fig. 2 Separation of magnetic particles by a disposable dispensing tip.

した粒子を順次試薬に移送する、逆転の発想によるものである。つまり、磁性体微粒子を単独あるいは溶液として指定する試薬、または、DNA変性に必要な加温部・冷却部に自在に移送することが容易に行えるため、核酸分離・抽出工程を分注機ユニットだけで完全にコントロールすることができ、しかもその工程をサンプルごとに用意されたディスポーザブルチップ1本にて行うため、原理的にクロスコンタミネーションを防止できる。また、核酸分離・抽出反応においては、試薬の水溶系・有機溶媒系などの種

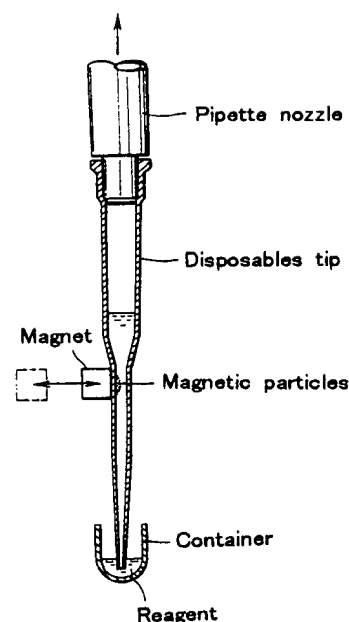


Fig. 3 Shape of the dispensing tip and the attracting/releasing method.

類・濃度、溶解の対象となる血液・大腸菌などの材料、DNA, RNA, mRNAなどの抽出目的物質、さらには、使用される磁性体微粒子の磁性強度差・分散性などにより、その反応工程も溶液の挙動も大きく差異がある。それら多岐・複雑な状況に対応するため、分離・攪拌・洗浄・再懸濁の各段階に、この吸引・吐出の至適条件を、操作性の良いWINDOWSソフトにより、正に自在設定が可能に設計されている。分離の場合は、磁性粒子の大きさあるいは磁性物質含有率など、着磁強度の差により、シリンダーを低速駆動させ、キャピラリー通過時間を10秒・20秒・30秒などと設定でき、また、その通過回数も指定できる。攪拌の場合は、磁石離脱後、高速吸引・吐出を繰り返してキャピラリー内壁にペレット状に付着した粒子に衝撃を与えて再懸濁させるが、その際の吸引量、吸引・吐出スピード、繰り返し回数を設定できる。洗浄の場合は、攪拌と同様の条件にて、洗浄液体中にて行い、分注チップ内と粒子表面を洗浄する。この洗浄工程は、免疫反応の際は非常に重要で、サンプル・標識物質を完全に除去することができれば、微量目的物質などの高感度定量化が達成できることになり、今後の遺伝子機能解析にても必要な性能となる。Magtration Technologyの今一つの実用的特徴は、処理能力あるいは、反応試薬量に関するいろいろな要求に関し、ノズル本数、シリンダー容積の変更だけで達成可能であり、装置の基本構成、ソフト変更は必要としない点である。研究目的の具体的事例を振り返ると、千差万別な条件対応が必要であり、研究を足踏みさせないためには、システム変更の容易性もまた、重要な自動装置設計上の要素といえる。

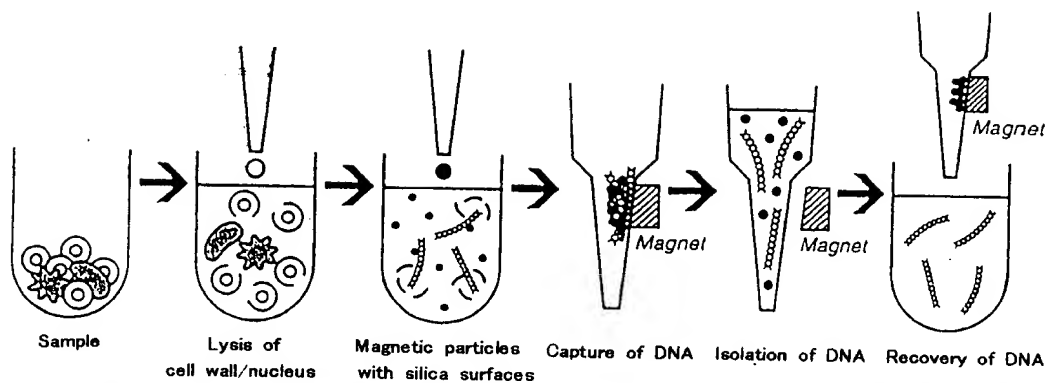


Fig. 4 DNA extraction.

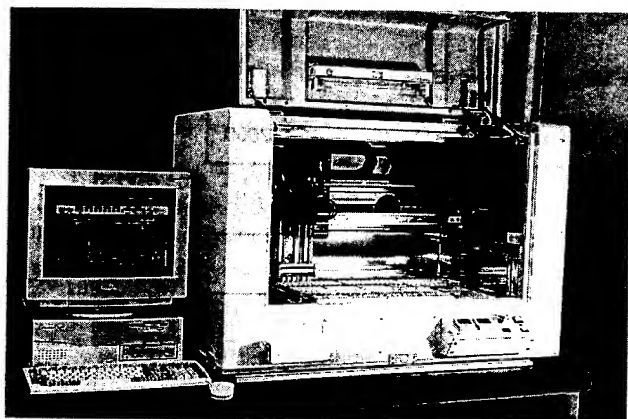


Fig. 5 Six-nozzle instrument (type SX-6G).

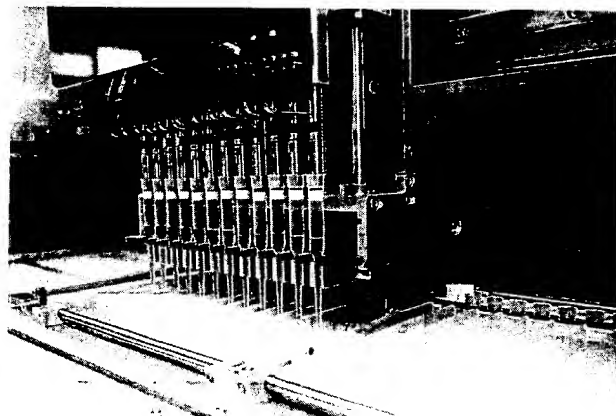


Fig. 6 Twelve-nozzle magtration unit.

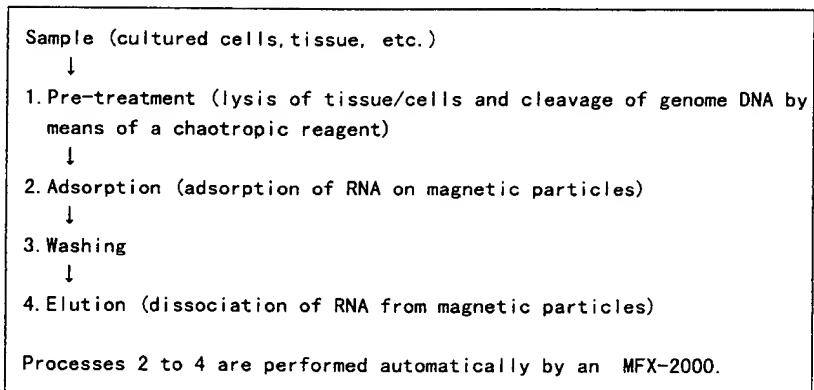


Fig. 7 Automated DNA extraction process using a Toyobo reagent kit.

Sample	Volume	Yield	Purity (A260/A280)	Used for
Cultured cells	~5 x 10 ⁶ cells	~10 ug/30 mg		
Tissue	~30 mg	~ 5 ug/30 mg	1.9 ± 0.1	RT-PCR
Yeast	~10 O.D. (660 nm) Cells recovered from 0.5 ml cultured medium.	~20 ug/5 O.D.		

Fig. 8 Performance of DNA extraction.

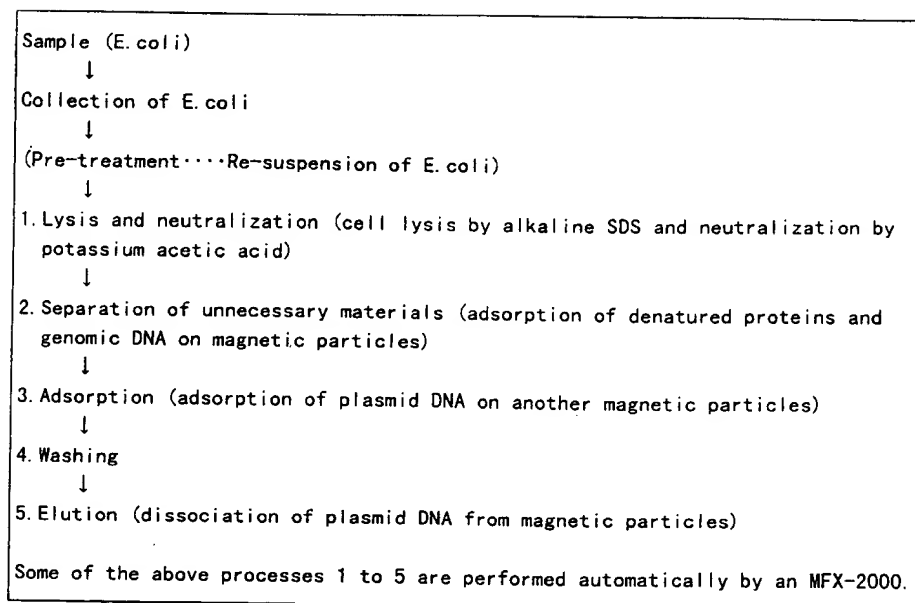


Fig. 9 Automated plasmid extraction process using a Toyobo reagent kit.

Sample	Yield	Purity(A260/A280)	Used for
E. coli	3 to 6 ug/3 to 9 O.D.	1.8 ± 0.1	Restriction enzyme digestion sequencing

Fig. 10 Performance of plasmid extraction.

5. 遺伝子抽出の例

この原理を利用して、TOYOBO が試薬と自動装置を Mag Extractor System (MFX-2000) として上市している。ここでは、Genome DNA, Plasmid DNA の処理工程と、それぞれの抽出性能を紹介する。反応工程のフレキシビリティを利用して、すでに Total RNA, Viral RNA, Plant Genome もひき続き製品化されていて、今後目的別に幅広い試薬キット化が期待される。

6. 将来への展望

臨床免疫測定分野においては、検体サンプリング・反応・インキュベーション・標識・化学発光測定が全自動でなされていることは前に述べたが、筆者の機器設計の立場からすると、遺伝子分野における細胞前処理・核酸抽出・増幅・単離・標識・計測などの工程も非常に類似していて、核酸分離・抽出を原点に、今後、一貫自動化システムの開発が進んでいくものと考えられる。磁性体微粒子法は、基本的技術として有効な概念であり、さまざまな展開が考えられる。すでに、目的ごとに複数の異なった粒子を連続的に使用して、DNA チップ用自動核酸ラベリング装置、ルシフェラーゼ発現を用いた自動遺伝子ネットワーク解析装置、*in situ* hybridization を用いた自動核酸ラベリ

ング装置、化学発光を用いた変異・多型部位検出装置、DNA 自動クローニング装置などが構想され、現実的テーマとなりつつある。いずれにしても、21 世紀初頭にはヒトゲノムの解読が完了し、DNA 機能解析に向けて、新たにコンビナトリアルケミストリー¹⁶⁾の手法も取り入れたシステム開発が要求されてくることは確実で、高速・大量・高感度を目指し、現実性をもった技術として、磁力と磁性体の利用は大いに期待されている。

7. おわりに

筆者は、自動機器開発メーカーであり、磁気の詳細知識があるわけではなく、遺伝子についても研究機関の門前の小僧である。したがって、貴誌のご依頼に答えられたとは到底考えられない。ただ本稿の執筆に当たり、開発経緯を振り返って申し上げられることは、さまざまな専門知識の融合の面白さである。今回多くの先生方に“最先端”と言われる情報・技術のご提供・ご指導を頂いたが、しだいに交流が深まり、期せずして産学官の連携体制ができていった。それぞれの知識・経験を集積し、また迅速な相互の応答が行えるなら、決して欧米に劣らない成果を生み出せるのではないかと思う。磁性体を扱う機器メーカーとしては、次の製品開発に向け、磁力に関し勉強しなければならないことが多々あり、本誌の末尾をかりて、今後のご教授を

お願いするしだいである。

参考文献

- 1) R. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim: *Science*, **230**, 1350 (1985).
- 2) F. M. Ausubel, R. Brent, R. F. Kingston, R. R. Moore, J. G. Seidman, and J. A. Smith: *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. by K. Struhl (Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1987).
- 3) S. L. Berger and A. R. Kimmel: *Methods Enzymol.*, **152**, 215 (1987).
- 4) M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Suinsky, T. J. White: 斎藤隆監訳, PCR 実験マニュアル (HBJ 出版局, 東京, 1994).
- 5) 紫 忠義: 遺伝子工学 (講談社サイエンティフィック, 東京, 1995).
- 6) W. R. Boom, C. J. A. Sol, and J. van der Noordaa: *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 495 (1990).
- 7) K. S. Jakobsen, E. Breivold, and E. Hornes: *Nucl. Acids Res.*, **18**, 3669 (1990).
- 8) 加藤昭夫, 荒井弘道: 超微粒子 (その化学と機能) (朝倉書店, 1993).
- 9) T. L. Hawkins, T. O'Conner-Morin, A. Roy, and C. Santilan: *Nucl. Acids Res.*, **22**, 4543 (1994).
- 10) *Biomagnetic Techniques in Molecular Biology: Technical Handbook*, 2nd Edition, ed. by A. S. Dynal (Oslo, 1995).
- 11) T. Matsunaga, T. Sakaguchi, and F. Tadokoro: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 651 (1991).
- 12) C. Nakamura, J. G. Burgess, K. Soda, and T. Matsunaga: *J. Biol. Chem.*, **270**, 28392 (1995).
- 13) N. Nakamura, K. Hashimoto, and T. Matsunaga: *Anal. Chem.*, **63**, 268 (1991).
- 14) N. Nakamura, J. G. Burgess, K. Yagiuda, S. Kudo, T. Sakaguchi, and T. Matsunaga: *Anal. Chem.*, **65**, 2036 (1993).
- 15) 松永 是, 辻村範行: セラミックス, **30**, 359 (1994).
- 16) コンビナトリアルケミストリー研究会: コンビナトリアルケミストリー (化学同人, 1997).

(1998年1月30日受理)



田島秀二 たじま ひでじ

昭51 中央大学理工学部工業化学科卒,
同年 アドバンテック東洋(株)入社, 平元
プレジジョン・システム・サイエンス(株)
代表取締役就任, 現在に至る。
専門 精密分析機器設計